

基于结晶紫和核酸适配体的免标记荧光法检测中药中赭曲霉素 A

郭丽敏，杨圆圆，李贊，任蕾，王颖莉^{*}，刘计权
(山西中医药大学，山西晋中 030619)

摘要：目的 基于结晶紫和核酸适配体，建立免标记荧光法检测中药中赭曲霉素 A。方法 优化核酸适配体浓度、结晶紫浓度、金属离子 (Na^+ 、 Ca^{2+}) 浓度、pH 值，将检测方法应用于木槿皮、香加皮、桔梗和苦参。结果 最佳条件为核酸适配体浓度 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，结晶紫浓度 6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ， Na^+ 浓度 120 mmol/L， Ca^{2+} 浓度 15 mmol/L，pH 值 8.0。该方法在 20~800 nmol/L 范围内线性响应良好，检测限为 7.3 nmol/L，平均加样回收率 95.31%~120.9%，RSD 2.9%~9.8%。结论 该方法克服了传统赭曲霉素 A 检测手段前处理复杂的问题，缩减了时间与成本，同时实现了核酸适配体技术在中药质量控制领域的应用，为其安全性、有效性评估提供了新工具。

关键词：中药；赭曲霉素 A；免标记荧光法；结晶紫；核酸适配体

中图分类号：R284.1

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2025)05-1746-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.05.053

中医药在全球范围内受到广泛关注，但中药材的真菌毒素污染问题日益凸显^[1]，尤其是赭曲霉素 A，因其耐热性、肾毒性、胚胎毒性及潜在致癌性，已成为中药质量与安全的重大障碍^[2]。当前，我国中药产业蓬勃发展，真菌毒素污染监管体系与赭曲霉素 A 限量标准亟需完善^[3]。现有的赭曲霉素 A 检测方法包括高效液相色谱法 (HPLC) 和液相-质谱连用法 (LC-MS)^[4-5]，虽然精度高，但成本昂贵，操作复杂，需专业人员进行，以及免疫分析法，如酶联免疫吸附试验 (ELISA)^[6]，虽然特异性与灵敏度可观，但受抗原、抗体质量限制，制备繁琐，同时还有假阳性问题。

核酸适配体技术是新型生物识别手段，经指数富集配体系统进化 (SELEX) 技术筛选得^[7-9]，能精准结合靶标分子，在食品、饲料领域的赭曲霉素 A 检测中已广泛应用^[10-12]，但在中药领域才刚起步。荧光检测技术响应快，灵敏度高，操作简便，结合核酸适配体后用于赭曲霉素 A 检测时优势显著，并且免标记荧光法进一步提升了检测精度，但传统荧光标记物^[13-14]成本昂贵，水溶性差有生物安全风险，导致在相关检测中受限。本实验构建基于核酸适配体和结晶紫的免标记荧光法检测中药中的赭曲霉素 A，该方法特异性强，灵敏度高，免去核酸适配体标记修饰，降低成本，简化样品前处理流程，缩短检测时间，有望为相关质量评价体系建立提供新思路。

1 材料

赭曲霉素 A (批号 E23091009，纯度 ≥98%) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司)；赭曲霉素 B (批号 2J1J10，

纯度 ≥98%)、华法林钠 (批号 F920BA0505，纯度 ≥98%)、7-氨基-4-甲基香豆素 (批号 SLBZ6729，纯度 ≥99%)、N-乙酰-L-苯丙氨酸 (批号 EA19BA0016，纯度 ≥98%) (美国 Sigma-Aldrich 公司)；黄曲霉素 B₂ (G107BA0025，纯度 ≥98%)、结晶紫 (批号 H416BA0017)、NaCl (批号 K304BA0002)、CaCl₂ (批号 H415BA0015)、Tris-HCl (批号 J301KA8423) [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]；水为超纯水。木槿皮 (批号 20210718)、香加皮 (批号 20210719)、桔梗 (批号 20210724)、苦参 (批号 20210722) (四川湘起之秀中药材有限公司)，经山西中医药大学药用植物学教研室刘计权教授鉴定为正品。赭曲霉素 A 核酸适配体 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]，序列 5'-GATCGGGTGTGGTGGCGTAAAGGGAGCATGGACA-3'。

Pur-11-20I 型超纯水机 (西安优普仪器设备有限公司)；F97Pro14043 型荧光光度计 (上海棱光技术有限公司)；MIX-28 型涡旋混匀器 (杭州米欧仪器有限公司)。

2 方法

2.1 赭曲霉素 A 制备 将 40 μL 18 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 结晶紫溶液与 40 μL 3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 核酸适配体缓冲液 (含 10 mmol/L Tris-HCl、120 mmol/L NaCl、15 mmol/L CaCl₂，pH 8.0) 混合，室温孵育 10 min，加入 40 μL 不同浓度的赭曲霉素 A 缓冲液，将混合液置于恒温孵育仪中反应 (25 °C、650 r/min) 40 min，转移至荧光分光光度计中测定荧光强度。

2.2 对照实验 为了评价方法特异性，分别选择华法林钠、7-氨基-4-甲基香豆素、N-乙酰-L-苯丙氨酸、赭曲霉素

收稿日期：2024-12-30

基金项目：国家自然科学基金项目 (81803725)；山西省中医药科研课题 (2022ZYYC107)；山西中医药大学博士启动金基金 (2023BK42)；山西中医药大学科技创新能力培育计划 (2022PY-TH-08)

作者简介：郭丽敏 (1979—)，女，博士，副教授，从事中药质量鉴定研究。Tel: (0351) 3179903, E-mail: glmlj2018@163.com

*通信作者：王颖莉 (1967—)，女，博士，教授，从事中药/天然药物化学研究。Tel: (0351) 3179766, E-mail: wyltyut@163.com

B、黄曲霉素B₂、玉米赤酶烯酮作为潜在干扰物质，其中N-乙酰-L-苯丙氨酸、华法林钠和7-氨基-4-甲基香豆素因结构与赭曲霉毒素A相似而作为结构类似物质，而其他3种可能是与赭曲霉毒素A共存的真菌毒素。再设计3个对照组，第1组为单一干扰物质组（5 μmol/L溶液），第2组为赭曲霉毒素A（500 nmol/L）与单一干扰物质（5 μmol/L）的混合组，第3组为赭曲霉毒素A（500 nmol/L）与所有干扰物质（5 μmol/L）的混合组，按“2.1”项下方法测定荧光强度。

2.3 中药溶液制备 称取木槿皮、香加皮、桔梗、苦参各约10 g，加入100 mL二次蒸馏水，浸泡30 min后微沸10 min，室温静置冷却，取上清液至离心管中，12 000 r/min离心15 min，收集上清液，用缓冲液稀释20倍，即得。以其代替缓冲液，制备系列含不同浓度赭曲霉毒素A的溶液，按“2.1”项下方法测定荧光强度。

2.4 测定条件 激发狭缝宽度10 nm；发射狭缝宽度20 nm；激发波长570 nm；发射波长范围600~750 nm。

3 结果

3.1 实验原理 如图1所示，在水溶液环境中结晶紫本身荧光信号微弱，但引入核酸适配体后会显著增强，可能是两者之间的静电吸附作用所致，其前者被吸附至后者疏水环境中^[15-16]。另外，在赭曲霉毒素A存在的情况下核酸适配体优先与其结合，导致本身结构发生显著变化，形成稳定的G-四链体结构，显著降低两者之间的静电吸附作用，导致结晶紫逐渐解离，进而引起荧光信号下降，故通过监测荧光信号变化能实现对赭曲霉毒素A的定量分析。



图1 基于结晶紫和核酸适配体荧光体系检测赭曲霉毒素A原理图

3.2 可行性分析 如图2所示，当体系（含1 μmol/L核酸适配体、6 μmol/L结晶紫、500 nmol/L赭曲霉毒素A、120 mmol/L Na⁺、15 mmol/L Ca²⁺，pH值8.0）中仅有结晶紫时荧光信号微弱，而加入核酸适配体后显著增强，表明两者之间成功形成复合物，而且前者在后者环境中得到有效保护；加入赭曲霉毒素A后荧光强度明显下降，可能是因为核酸适配体倾向于与其结合，形成稳定的G-四链体结构，导致与结晶紫之间的静电吸附作用减弱而使后者解离并重新分散至水溶液中，上述结果证实了该方法在赭曲霉毒素A检测方面的有效性和可靠性。

3.3 实验条件优化

3.3.1 核酸适配体浓度 固定赭曲霉毒素A浓度500 nmol/L，结晶紫浓度6 μmol/L，Na⁺浓度120 mmol/L，Ca²⁺浓度15 mmol/L，pH值8.0，通过测定核酸适配体/结晶紫复合物的初始荧光信号F₀及赭曲霉毒素A存在时的荧光信号F，计算变化值△F/F₀，公式为△F/F₀=F₀-F，结果见

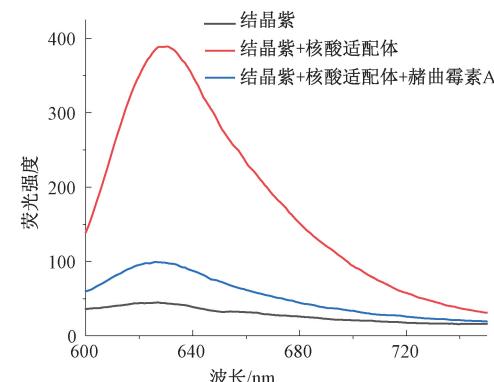


图2 可行性分析结果 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

图3。由此可知，当核酸适配体为0~1 μmol/L时，△F/F₀升高，为1 μmol/L时达到最大值，之后趋于稳定，表明低浓度下核酸适配体单链上的结晶紫吸附量少，而随着其浓度增加可结合更多结晶紫，导致荧光信号显著增强，故确定为1 μmol/L。

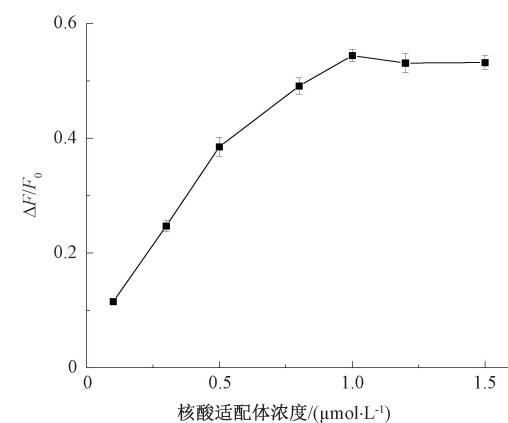
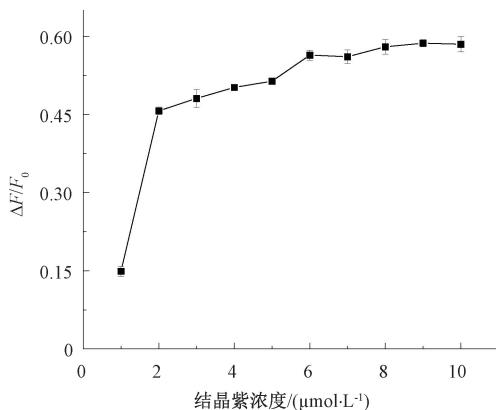


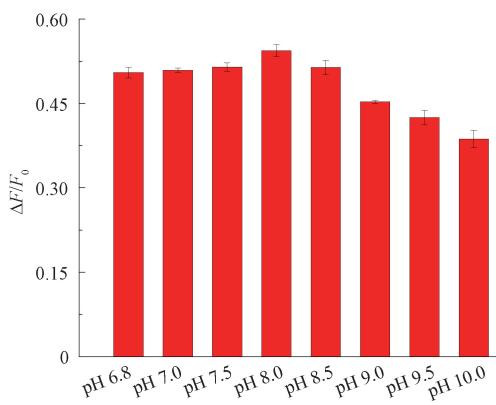
图3 核酸适配体浓度对△F/F₀的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3.3.2 结晶紫浓度 固定赭曲霉毒素A浓度500 nmol/L，核酸适配体浓度1 μmol/L，Na⁺浓度120 mmol/L，Ca²⁺浓度15 mmol/L，pH值8.0，结果见图4。由此可知，当结晶紫浓度为0~6 μmol/L时△F/F₀升高，为6 μmol/L时达到最大值，之后趋于稳定，这是因为随着结晶紫浓度增加其与核酸适配体的静电吸附作用增强，导致荧光信号变化显著，为6 μmol/L时吸附量接近饱和，荧光信号最大，实验效果最佳，故确定为6 μmol/L。

3.3.3 pH值 pH值对赭曲霉毒素A诱导核酸适配体形成G-四链体的稳定性有显著影响，而且酸性条件会降低两者亲和力^[17]。固定赭曲霉毒素A浓度500 nmol/L，核酸适配体浓度1 μmol/L，结晶紫浓度6 μmol/L，Na⁺浓度120 mmol/L，Ca²⁺浓度15 mmol/L，结果见图5。由此可知，当pH值为0~8.0时△F/F₀无明显变化，表明赭曲霉毒素A与核酸适配体的亲和力及结晶紫的荧光信号无明显差异；为8.0时达到最大值，表明在弱碱性条件下两者亲和力最大，荧光信号变化最明显；大于8.0后显著降低，表明pH值过高对核酸适配体的结构稳定性或赭曲霉毒素A与核酸适配体

图4 结晶紫浓度对 $\Delta F/F_0$ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的亲和力产生不利影响，故确定为8.0。

图5 pH值对 $\Delta F/F_0$ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

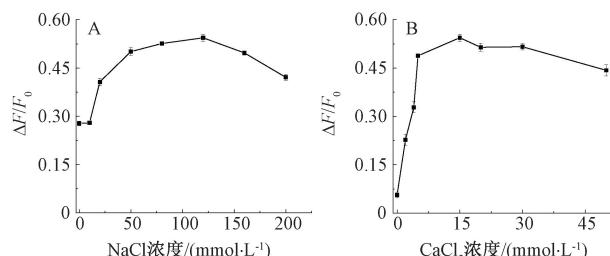
3.3.4 金属离子浓度 金属阳离子，如 Na^+ 、 Ca^{2+} 等，对核酸适配体的稳定性和赭曲霉素A的识别能力具有至关重要的作用^[18]。固定核酸适配体浓度1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，结晶紫浓度6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，pH值8.0，结果见图6。由此可知，随着 Na^+ 、 Ca^{2+} 浓度增加 $\Delta F/F_0$ 升高，表明金属离子对核酸适配体特异性识别赭曲霉素A有促进作用；当两者浓度分别为120、15 mmol/L 时达到最大值，表明在该浓度下阳离子对核酸适配体与赭曲霉素A结合的促进作用最显著，故分别确定为120、15 mmol/L 。

3.4 方法学考察

3.4.1 线性关系考察和检测方法比较

由图7A可知，随

表1 赭曲霉素A检测方法比较

图6 Na^+ (A)、 Ca^{2+} (B) 浓度对 $\Delta F/F_0$ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

着赭曲霉素A浓度增加荧光信号下降，表明更多的核酸适配体在赭曲霉素A诱导下形成G-四链体结构，导致结晶紫与前者之间的静电吸附作用减弱而解离， $\Delta F/F_0$ 逐渐升高。由图7B可知，当赭曲霉素A浓度为20~800 nmol/L时，其浓度(X)与 $\Delta F/F_0$ (Y)呈线性相关，方程为 $Y = 8.33 \times 10^{-4}X + 0.113$ ($R^2 = 0.9920$)，检出限(空白值标准偏差除以标准曲线斜率的3倍)为7.3 nmol/L。

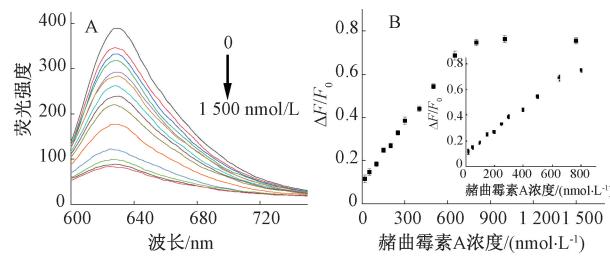


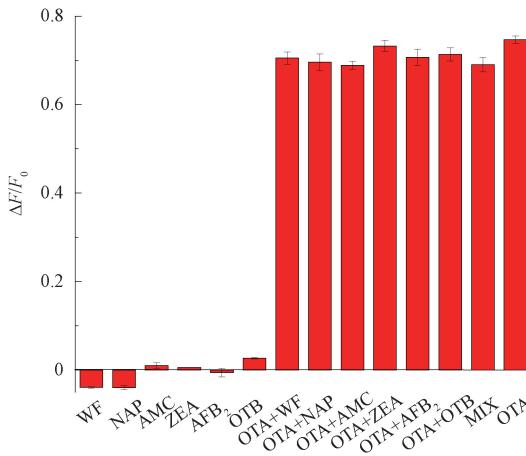
图7 赭曲霉素A线性关系

为了进一步评估该方法性能，本实验将其与前期报道中基于核酸适配体检测赭曲霉素A的方法进行比较，结果见表1。由此可知，与量子点荧光猝灭法^[19]、基于核酸适配体荧光标记及荧光共振能量转移的方法^[20]相比，本实验方法展现出更低的检出限和更宽的线性范围；与基于二氧化硅纳米颗粒的荧光标记法^[21]、比率型荧光纸芯片技术^[22]、基于碳点的无淬灭剂荧光适配体技术^[23]相比，本实验方法在技术性能上保持了相当水平；虽然其检测限高于基于Apt-NCs/氧化石墨烯(GO)纳米复合物的荧光法^[24]，但具有设计简单、成本低廉、性能良好、无需对核酸适配体进行标记的优势，显著减少了对核酸适配体稳定性和特异性的影响。

3.4.2 特异性试验 由图8可知，当体系中仅存在单一干扰物质时 $\Delta F/F_0$ 无明显变化，表明它们未引起核酸适配体

结构转换，也不能引起结晶紫荧光信号变化；赭曲霉素A与任一单一干扰物质混合后的荧光信号与前者的接近，表

明干扰物质不会影响该成分和核酸适配体的特异性结合；在所有干扰物质与赭曲霉素 A 共存的条件下 $\Delta F/F_0$ 与仅有赭曲霉素 A 时的接近，进一步证实该方法具有出色的特异性和抗干扰能力。



注：WF、NAP、AMC、ZEA、AFB₂、OTB、OTA 分别为华法林钠、N-乙酰-L-苯丙氨酸、7-氨基-4-甲基香豆素、玉米赤霉烯酮、黄曲霉素 B₂、赭曲霉素 B、赭曲霉素 A。

图 8 特异性试验结果 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

3.4.3 专属性试验 在“2.3”项下 4 种中药溶液中加入结晶紫和核酸适配体，测定加入赭曲霉素 A 前后的荧光信号。结果，加入核酸适配体后荧光信号显著增强，与缓冲液基本一致，表明中药复杂基质并未对结晶紫与核酸适配体之间的作用产生明显干扰；加入赭曲霉素 A 后荧光信号明显下降，并且其程度与缓冲液无显著差异，有力地证明了赭曲霉素 A 与核酸适配体之间的特异性结合也未受到中药复杂基质的显著影响，该方法专属性良好。

3.4.4 重复性实验 按“2.3”项下方法制备含 500 nmol/L 赭曲霉素 A 的中药溶液，测定荧光信号 6 次。结果， $\Delta F/F_0$ 的 RSD 为 4.09%，表明该方法重复性良好。

3.4.5 稳定性实验 按“2.3”项下方法平行制备含 500 nmol/L 赭曲霉素 A 的中药溶液各 3 份，放置 0、12、24、36、48、72 h 后测定荧光信号。结果，放置 72 h 后荧光信号仍能维持在初始值的 109.87%，表明溶液在 72 h 内稳定性良好。

3.5 中药检测 按“2.2.3”项下方法制备中药溶液，缓冲液稀释 20 倍，并加入不同浓度赭曲霉素 A，计算回收率，结果见表 2。由此可知，中药中赭曲霉素 A 检测值与缓冲液中的接近，表明该方法准确度良好。

4 讨论与结论

本实验根据结晶紫在水溶液中、加入核酸适配体后、加入赭曲霉素 A 后荧光信号的变化，达到检测中药中赭曲霉素 A 的目的。在优化条件下，体系荧光信号变化值 $\Delta F/F_0$ 与赭曲霉素 A 浓度在 20~800 nmol/L 范围内呈现良好相关性，检出限低至 7.3 nmol/L，并且该方法展现出良好的特异性，能有效区分赭曲霉素 A 与结构类似物或可能共存的

表 2 赭曲霉素 A 加样回收率试验结果 (n=3)

中药	加入量/ (nmol·L ⁻¹)	平均回收量/ (nmol·L ⁻¹)	平均回收 率/%	RSD/%
木槿皮	20	19.51	97.56	9.8
	100	96.98	96.98	5.9
	200	194.2	97.11	8.6
	500	510.8	102.2	4.3
	800	1072	120.9	9.6
	20	19.46	97.30	7.7
香加皮	100	97.42	97.42	3.4
	200	209.5	104.8	8.7
	500	511.9	102.4	9.2
	800	862.2	107.8	6.9
	20	20.17	100.9	7.1
	100	100.6	100.6	9.0
桔梗	200	209.5	104.8	9.1
	500	476.6	95.31	5.7
	800	894.1	117.6	6.3
	20	19.08	95.40	7.2
	100	102.6	102.6	3.2
	200	207.4	103.7	2.9
苦参	500	508.5	101.7	6.1
	800	890.4	111.3	5.5

真菌毒素。另外，它还避免了传统标记过程对核酸适配体稳定性和特异性的潜在影响，从而提高了检测准确性和可靠性。

在木槿皮、香加皮、桔梗、苦参的实际应用中，基于结晶紫和核酸适配体的免标记荧光法表现出良好的准确度和回收率，证明其在复杂基质中检测的潜力。但结晶紫作为荧光信号探针，在特定波长下可能受到某些中药成分的干扰，导致该方法适用性受限，故今后将采用 HPLC、LC-MS 等手段对干扰严重的样品进行分析，确定其具体成分，并对不同品种进行筛查，以评估上述现象的普遍性和严重程度，为其进一步优化与改进提供科学依据。同时，还可通过调整适配体序列来探索基于结晶紫和核酸适配体的免标记荧光法检测中药中其他污染物的可行性，从而构建一套更全面高效的相关检测体系。

致谢：本实验所用仪器由山西中医药大学实验管理中心公共研究平台提供，实验中得到了中药微乳技术国家与地方联合工程实验室；中药微乳与生物新制剂研发山西省 1331 工程（技术）研究中心；山西省现代中药工程实验室的帮助，特此感谢。

参考文献：

- [1] 刘丽娜, 李海亮, 李耀磊, 等. 中药真菌毒素质量控制概况、限量标准制定及有关问题的思考 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6197-6207.
- [2] 王晓萱, 赵琳琳, 李露露, 等. 赭曲霉素 A 对动物的危害及脱毒研究进展 [J]. 动物营养学报, 2024, 36(1): 107-114.
- [3] 王 镶, 秦晓雅, 周 恒, 等. 中药中真菌毒素快速检测技术研究进展及应用 [J]. 分析测试学报, 2023, 42(8): 1047-1055.
- [4] 曾 慧, 张明珠. 液液萃取-高效液相色谱法测定红茶中赭

- 曲霉毒素 A [J]. 饮料工业, 2023, 26(2): 25-28.
- [5] 唐德红, 张季, 张冰雪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定全麦粉中的赭曲霉毒素 A [J]. 食品安全导刊, 2023(28): 109-115.
- [6] Zhao L Y, Liu J, Bai B, et al. Natural deep eutectic solvent-based QuEChERS followed by magnetic beads ELISA for the analysis of ochratoxin A in cereal samples[J]. *Food Control*, 2024, 161110384.
- [7] Zhang W Q, Sun Z C, Tian Y H, et al. Ratiometric fluorescent sensor based on a truncated specific aptamer by MGO-SELEX screening for streptomycin detection[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2024, 406: 135427.
- [8] 张鑫娜, 黄智勇, 彭瑞资. 核酸适配体在分子医学中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(9): 2037-2050.
- [9] 孟雪洁, 张瑜, 刘京华, 等. 纳米金-适配体电化学传感器用于环境水样中双酚 A 检测[J]. 环境化学, 2023, 42(2): 379-387.
- [10] Cruz-Aguado J A, Penner G. Determination of ochratoxin a with a DNA aptamer[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(22): 10456-10461.
- [11] 秦英凯, 李双, 王瑜, 等. 磁控双色上转换荧光适配体传感器同时检测玉米和燕麦粉中的赭曲霉毒素 A 与玉米赤霉烯酮[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(8): 2580-2588.
- [12] 雷雨燕, 李晓晖, 刘义, 等. 基于核酸适配体的生物标志物检测方法研究进展[J]. 化学通报, 2024, 87(1): 36-43.
- [13] Tang J D, Tian B, Tao X Q. A colorimetric aptasensor for detecting ochratoxin A based on label-free aptamer and gold nanozyme[J]. *Anal Sci*, 2023, 39(10): 1623-1626.
- [14] Yu P F, Wu Y Y, Liu A Q, et al. A label-free photoelectrochemical aptamer sensor based on in situ Ag₂S quantum dot-sensitized BiOI/CdWO₄ heterojunction for detection of ochratoxin A[J]. *Microchem J*, 2024, 200: 110260.
- [15] 刘萍, 陈凤英, 张国春, 等. 用结晶紫为荧光指示剂筛选 G-四链体的小分子配体[J]. 分析试验室, 2012, 31(4): 4-7.
- [16] Zheng B, Cheng S, Dong H Z, et al. Label free determination of potassium ions using crystal violet and thrombin-binding aptamer[J]. *Anal Lett*, 2014, 47(10): 1726-1736.
- [17] Miao M S, Guo L, Xue J Y, et al. A controllable Y-shaped DNA structure assisted aptasensor for the simultaneous detection of AFB₁ and OTA based on ARGET ATRP[J]. *J Mater Chem B*, 2024, 12(24): 5861-5868.
- [18] Geng X, Zhang D P, Wang H L, et al. Screening interaction between ochratoxin A and aptamers by fluorescence anisotropy approach[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(8): 2443-2449.
- [19] 杜凌云, 桑滨, 王春蕾, 等. 量子点荧光共振能量转移检测赭曲霉毒素 A[J]. 化学研究与应用, 2022, 34(4): 802-807.
- [20] 刘诺亚, 赵新月, 张晓萌, 等. 基于核酸适配体荧光标记及荧光共振能量转移检测赭曲霉毒素 A[J]. 分析科学学报, 2022, 38(6): 711-715.
- [21] 张红艳, 黄丽珊, 魏小红, 等. 基于适配体荧光传感器检测山药和薏苡仁中的赭曲霉毒素 A[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(3): 874-880.
- [22] 林浩, 贺璇, 陈燕, 等. 比率型荧光纸芯片快速检测赭曲霉毒素 A[J]. 分析化学, 2022, 50(9): 1336-1347.
- [23] 李洁, 刘诺亚, 宋玉竹, 等. 基于碳点的新型无淬灭剂荧光适配体传感器检测赭曲霉毒素 A (英文) [J], 中国生物化学与分子生物学报, 2023, 39(2): 295-302.
- [24] 刘炉英, 刘锦辉, 胡小刚. 基于核酸适配体修饰复合纳米纤维的分散固相萃取技术在赭曲霉毒素 A 检测中的应用[J]. 分析化学, 2021, 49(12): 2096-2105.